

ÉTUDE MICROSCOPIQUE COMPARÉE DES ÉTAPES DE LA GERMINATION DE *SPHACELOTHECA REILIANA* (KÜHN) CLINTON, SUR MILIEU ARTIFICIEL ET SUR PLANTULES DE MAÏS

par C. VERGNET et E. EBLE*

* INRA-SRIV, route de St Cyr, 78000 Versailles.

RÉSUMÉ - La germination des téliospores de *S. reiliana* sur milieu de culture ou au contact de racines de maïs est observée en microscopie optique et électronique à balayage. Des sporidies sont toujours formées *in vitro*, mais très rarement au contact de l'hôte. Dans ce cas, les quelques sporidies produites fusionnent rapidement, sans bourgeonner. Aucune germination n'a été observée sur les coléoptiles de plantules de maïs, mais les téliospores germées sont très abondantes au niveau des autres parties souterraines de la plante (racines et mésocotyle), et ce, quel que soit le niveau de sensibilité du génotype à la maladie. La plasmogamie se produit entre articles d'un même promycélium, ou appartenant à deux promycéliums issus d'une même téliospore. Le filament se développe, parfois en se ramifiant, et semble pénétrer directement dans les tissus de l'hôte. Les conséquences de ce mode de germination au niveau de la variabilité du pouvoir pathogène du champignon sont discutées.

ABSTRACT - Germination of *S. reiliana* teliospores is observed by photonic or scanning electron microscopy. On a culture medium, the fungus produces budding sporidia but it does not usually when put in contact with underground parts of corn seedlings. In this case, it forms a branched infectious mycelium, whether the variety is receptive to the disease or not. Plasmogamy, of different types, occurs between adjacent cells, and infection is realized directly through the host's tissues. Consequences on the potential variability of the pathogen are discussed.

MOTS CLÉS : *Sphacelotheca reiliana*, Charbon des inflorescences, germination, plasmogamie, variabilité.

INTRODUCTION

Comme le mentionne Zambettakis (1973), l'étude de la germination des *Ustilaginales* présente à la fois un intérêt pour le systématicien, et pour le pathologiste car cette étape est fondamentale pour suivre les autres phases de développement de ces micro-organismes.

Dans le cas de *Sphacelotheca reiliana* Kühn (Clint.), agent du charbon des inflorescences du Maïs et du Sorgho, l'observation *in situ* de ce phénomène est difficile car la pénétration se produit dans le sol (Potter, 1914).

Cependant, comme cela a pu être observé dans le cas d'autres *Ustilaginales*, il a été démontré que, *in vitro*, la nature du milieu peut influencer sur le taux de germination des téliospores de ce champignon (Gastou, 1981). Faute de disposer d'une méthode permettant d'éliminer la totalité des contaminants éventuels, et du fait que le sol est un milieu "opaque", aucune étude à l'heure actuelle n'a permis de comparer le mode de germination de *S. reiliana* en conditions artificielles et au contact des tissus de son hôte. Il est en effet envisageable que la fusion cellulaire, phénomène indispensable après la germination des téliospores, se produise de façon différente dans ces deux conditions (Western, 1937; Holton & al., 1968). Cette étape présente par ailleurs un intérêt pour le pathologiste car elle peut influencer sur la variabilité du pouvoir pathogène du champignon (Zambettakis, 1977, 1978). Cette information intéresse donc également le sélectionneur.

Sur Sorgho, quatre races physiologiques de *S. reiliana* sont apparues successivement, chacune conservant les caractères de virulence de la précédente (Frederiksen & al., 1975; Stromberg & al., 1984). La connaissance du mode de germination des téliospores de l'agent pathogène au contact des tissus de cet hôte peut apporter certains éléments explicatifs à ces événements. C'est pourquoi, nous nous proposons d'étudier comparativement, par le biais de la microscopie optique et électronique à balayage, le mode de germination de *S. reiliana* sur milieu artificiel, et au contact de plantules de Maïs.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Des téliospores issues d'un sore récolté sur l'hybride de maïs F7 x F2 sont utilisées. Elles sont désinfectées superficiellement par immersion (5mn) dans l'éthanol (90°), suivi de trois rinçages à l'eau distillée stérile. Des travaux antérieurs (Vergnet, 1987) ont en effet permis de démontrer que ce temps de contact avec l'alcool n'altère pas la capacité germinative des spores mais suffit à éliminer l'ensemble des contaminants (champignons et bactéries). Les rinçages permettent de disposer d'une suspension de spores dans une solution non phytotoxique.

Les spores ainsi désinfectées sont déposées, soit sur un milieu malt solide (12g de malt et 10g d'agar, par litre d'eau distillée, pH 5.5), soit au contact des organes de l'hôte.

Deux variétés de maïs, l'une sensible à la maladie (ALBIN - INRA 311), l'autre résistante (OGALO), sont utilisées. Les semences sont désinfectées superficiellement par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium (20° chl.). Après 10 mn d'agitation, on procède à 3 rinçages à l'eau distillée stérile. Par la suite, 2 graines sont déposées par boîte de Pétri (diam. 9cm) contenant 2 feuilles de papier filtre imbibées d'eau stérile. Après 4 jours de culture (30°C à l'obscurité), la germination a débuté et l'on peut déposer des spores à différents niveaux (racines séminales, mésocotyle, caryopse, coléoptile).

Les boîtes sont replacées pour 4 jours à l'étuve (30°C à l'obscurité); à la fin de cette période, la plupart des stades de la germination des spores peuvent être observés. Sur milieu artificiel, 3 jours d'incubation dans les mêmes conditions sont suffisants.

Les téliospores ayant germé sur malt-agar, ainsi que les coupes longitudinales réalisées dans les divers organes, sont colorées directement au bleu coton (C4B), chauffées et observées au microscope optique. Les préparations sont, pour la plupart, lutées à l'aide de vernis à ongle afin de pouvoir être conservées. D'autres prélèvements sont observés directement au microscope électronique à balayage après congélation et métallisation à l'or par pulvérisation cathodique.

RÉSULTATS

Germination et formation de promycélium

Dans le sol, les téliospores apparaissent souvent associées en chapelets (Fig. 1). Lors de la germination, la probaside perce l'exospore finement et régulièrement échinulée (Fig. 3 et 4). Cette membrane de protection peut alors se détacher, et il est fréquent d'observer des enveloppes vides, la probaside n'étant alors délimitée que par l'endospore (Fig. 2). Par la suite, un promycélium à quatre cellules est formé (Fig. 5). Cependant, certaines spores peuvent produire plusieurs promycéliums (Fig. 10).

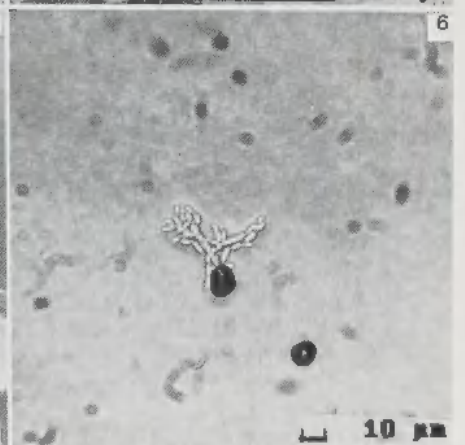
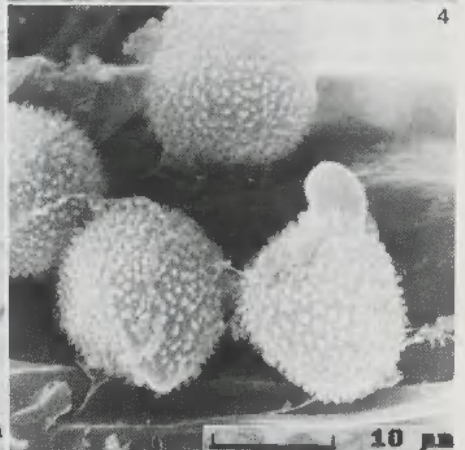
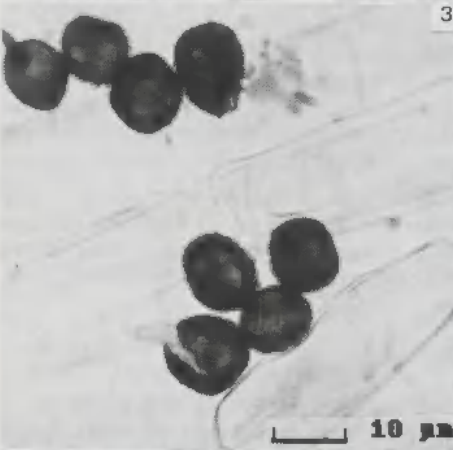
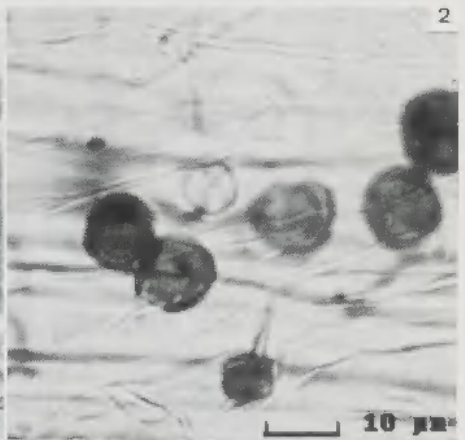
Ces premières étapes se produisent de la même façon, et avec la même fréquence, sur milieu artificiel et au contact de certains tissus de l'hôte (racines séminales ou mésocotyle). Il n'a jamais été observé de germination dans le cas de téliospores déposées sur les coléoptiles. Enfin, le taux de germination est similaire au contact des deux variétés de maïs.

Formation de sporidies et plasmogamie

Cette étape se déroule de façon nettement distincte sur milieu artificiel et au contact des cellules de l'hôte. Dans le premier cas, les cellules promycéliennes produisent, toujours par bougeonnement au niveau des *septa*, des sporidies qui elles-mêmes se multiplient en sporidies secondaires (Fig. 6). Ces basidiospores ne fusionnent jamais *in vitro* et on observe rapidement des colonies d'aspect similaire à celles formées par les levures.

Dans le second cas, la formation de sporidies n'est observée que très rarement. Les quelques basidiospores visibles germent et fusionnent sans bourgeonner (Fig. 7). On constate en revanche la production de ramifications promycéliennes secondaires ou une croissance apicale du promycélium qui compte alors davantage de cellules que les quatre initiales (Fig. 8).

Divers types de fusions entre articles du promycélium ont pu être observés. Dans le cas de filaments germinatifs à croissance indéfinie, les cellules de la base apparaissent vides; il est probable que leur contenu est passé directement *via* le septum dans l'article adjacent (Fig. 8).



La plasmogamie peut également se produire suite à la formation d'une anse de communication. Cette dernière peut relier deux articles voisins appartenant à un même promycélium (Fig. 9), ou deux éléments appartenant à deux promycéliums distincts issus d'une même spore (Fig. 10). Aucune fusion entre éléments formés par deux téliospores différentes n'a été observée.

Le dicaryon ainsi reconstitué peut, par la suite, pénétrer directement entre les cellules de l'hôte (Fig. 11).

DISCUSSION ET CONCLUSION

Bien que les premières étapes s'effectuent de façon similaire, le mode de germination de *S. reiliana* sur milieu de culture, et dans des conditions plus proches de la nature, est nettement différent.

In vivo, le passage par la phase haploïde est peu fréquent, et ne peut en aucun cas constituer un moyen de dissémination, comme cela a été envisagé dans le cas d' *Ustilago maydis* (Agrios, 1969).

Au contact de l'hôte, la durée de l'haplophase est très courte, et la plasmogamie s'effectue préférentiellement entre éléments issus d'une même téliospore.

D'autre part, si la germination se produit avec la même fréquence sur des plantules de maïs, quelque soit le niveau de sensibilité du génotype à la maladie, il semblerait qu'elle ne puisse pas se produire au contact des coléoptiles.

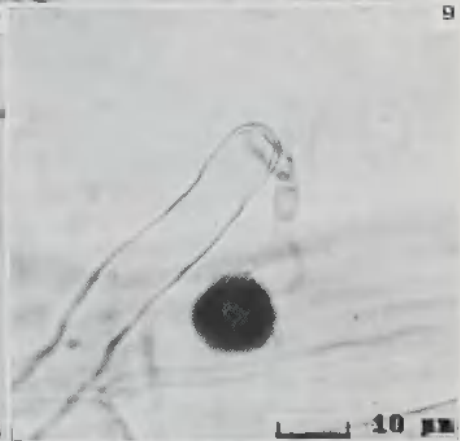
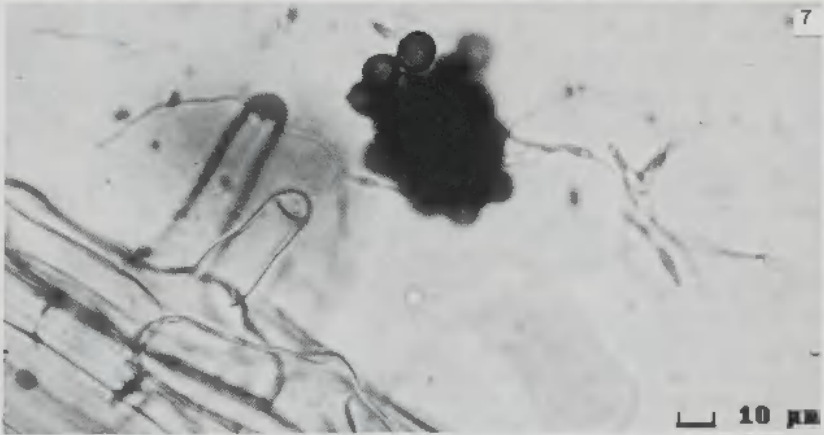
Cette dernière observation est en parfait accord avec les résultats obtenus par Baier & Kruger (1962) qui obtiennent peu de contaminations quand une couche de terre contaminée par *S. reiliana* est placée au-dessus des semences.

Cependant le point le plus important à retenir de nos travaux est que le passage de l'haplophase à la dicaryophase s'effectue principalement par la fusion d'éléments issus d'une même téliospore.

Les basidiospores ne joueraient donc pas un rôle important au niveau de l'épidémiologie du charbon des inflorescences du maïs. Ceci paraît peu surprenant car, comme le signalent Mills & Kotze (1981), l'infection réalisée à partir d'un filament directement issu d'une téliospore a davantage de chance de déboucher sur la formation d'une tumeur qu'une infection réalisée à partir de sporidies. En effet, la fusion entre tubes germinatifs de sporidies complémentaires n'est pas nécessaire dans le premier cas.

Fig. 1 - Association de téliospores dans un sol infesté. Fig. 2 - Téliospore libérée de l'exospore échinulée. Fig. 3 et 4 - Première phase de la germination. Fig. 5 - Promycélium typique à 4 cellules. Fig. 6 - Germination *in vitro* avec formation de basidiospores (sporidies) qui bourgeonnent de façon indéfinie.

Fig. 1 - Association of teliospores in an infected soil. Fig. 2 - Teliospore outside the echinulated exospore. Fig. 3 and 4 - First phase of spore germination. Fig. 5 - Typical 4 cells promycelium. Fig. 6 - *In vitro* germination with formation of budding basidiospores (sporidia).



En ce qui concerne *S. reiliana*, Mankin (1958) démontre que les résultats de confrontations deux à deux de 40 isoléments monosporidiaux, issus de 10 téliospores distinctes, ne peuvent s'interpréter correctement que si chaque sporidie représente un seul groupe de compatibilité. Néanmoins, cet auteur signale que, dans tous les cas, le nombre de sporidies qui fusionnent est très faible par rapport au nombre total des basidiospores présentes. La fusion entre sporidies de compatibilité complémentaire serait donc peu probable, ce qui est confirmé par nos observations.

De même que pour *S. reiliana*, Western (1937) constate qu'*Ustilago avenae* (Pers.) produit un promycélium infectieux. Par conséquent, le dicaryon comporterait des noyaux haploïdes directement dérivés du noyau diploïde de la chlamydospore. Cet auteur y voit une explication à la remarquable constance des races physiologiques d'*U. avenae*. Cette conclusion ne peut cependant pas être appliquée au charbon des inflorescences du Maïs et du Sorgho. Sur ce dernier hôte, Frederiksen (1977) signale l'existence de 4 races de cet agent pathogène. Les races 3 et 4 ont pris une extension notable dès 1975 (Frederiksen & al., 1975) suite à une forte pression de sélection (Horne, 1976). Sur Maïs en revanche, aucune race n'a été mise en évidence. Des modifications de virulence sont donc possibles chez *S. reiliana*.

En effet, le mode de plasmogamie observé ne fait que limiter les possibilités d'évolution du parasite. De plus, le passage par la phase sporidiale, bien que rare, demeure possible et l'apparition d'un variant ayant des caractères de virulence nouveaux peut en résulter (Watson, 1970).

En conditions de pression de sélection extrême, des individus de ce type, aptes à survivre dans le sol et ayant une capacité de multiplication suffisante pourraient être à l'origine d'une nouvelle race de parasite. Enfin, ces nouvelles populations pourraient résulter d'une autre forme d'échange génétique. Mills & Kotze (1981) dans le cas d'*U. maydis* et Gastou (1981) dans le cas de *S. reiliana* ont observé des anastomoses entre filaments promycéliens. Celles-ci pourraient permettre des échanges de noyaux et de cytoplasme entre hyphes génétiquement différents (Agrios, 1969).

En conclusion, il semblerait que la germination des téliospores de *S. reiliana* aboutisse préférentiellement à la formation directe d'un hyphe infectieux.

Fig. 7 - Présence de sporidies à proximité des racines, dans ce cas, on constate la formation de filaments germinatifs. Fig. 8 - Croissance indéfinie du promycélium, noter la présence d'une cellule vide à la base. Fig. 9 - Plasmogamie par formation d'une anse de communication entre articles adjacents d'un même promycélium. Fig. 10 - Plasmogamie entre cellules appartenant à 2 promycéliums issus d'une même téliospore. Fig. 11 - Pénétration directe de l'hôte par le promycélium.

Fig. 7 - Sporidia formation near a maize root, in this case, they have a mycelial growth. Fig. 8 - Mycelial growth of promycelium, note that the basal cell is empty. Fig. 9 - Plasmogamy between adjacent cells forming a communication bridge. Fig. 10 - Plasmogamy between 2 cells of 2 promycelia issued from a single teliospore. Fig. 11 - Direct infection of the host by a promycelium.

Dans le cas du Maïs, contrairement à ce qui a été constaté pour le Sorgho (Horne, 1976), aucune variété présentant une résistance spécifique n'a été cultivée de façon exclusive, et durant plusieurs années successives, dans des régions infestées. La plus faible pression de sélection exercée, associée au fait que, d'après nos observations, les possibilités d'échange génétique sont limitées, pourraient constituer les deux principaux facteurs explicatifs de la remarquable stabilité des résistances spécifiques décelées à ce jour.

BIBLIOGRAPHIE

- AGRIOS G.N., 1969 - *Plant pathology*. London, Academic Press.
- BAIFR W. and KRÜGER W., 1962 - *Sphacelotheca reiliana* on Maize II - fields studies on the effect of soil conditions. *S. African J. Agric. Sci.* 5: 183-191.
- FREDERIKSEN R.A., ROSENOW D.T. and REYFS L., 1975 - Races of *Sphacelotheca reiliana* on Sorghum in Texas. *Pl. Dis. Reporter* 59: 549-551.
- FREDERIKSEN R.A., 1977 - Head smut of corn and sorghum. *Corn Sorghum Res. Conf. Proc.* 32: 89-104.
- GASTOU M., 1981 - Étude du charbon de la panicule du sorgho (*Sphacelotheca reiliana* (Khun) Clinton) dans le Sud-Ouest de la France: incidence sur les rendements et facteurs favorisant son développement. Thèse 3ème cycle. Univ. Paul Sabatier, Toulouse, n° 2552.
- HOLTON C.S., HOFFMANN J.A. and DURAN R., 1968 - Variation in the smut fungi. *Annual Rev. Phytopathol.* 6: 213-214.
- HORNE C.W., 1976 - New race of head smut fungus poses a problem for grain sorghum producers. *Plant Disease Views and Reviews*, June 25. *Texas Agric. Ext. Ser.*
- MANKIN C.J., 1958 - Studies on the biology of *Sphacelotheca reiliana* causing head smut of corn. Ph. D. Thesis, State college of Washington.
- MILLS L.J. and KOTZE J.M., 1981 - Scanning electron microscopy of the germination, growth, and infection of *Ustilago maydis* on maize. *Phytopathology* 102: 21-27.
- POTTER A.A., 1914 - Head smut of sorghum and maize. *J. Agric. Res.* 2: 339-371.
- STROMBERG E.C., STIENSIRA W.C., KOMMEDAHL T., MATYAC C.A. and WINDELS C.E., 1984 - Smut expression and resistance of corn to *Sphacelotheca reiliana* in Minnesota. *Plant Disease* 68: 880-884.
- VERGNET C., 1987 - Le charbon des inflorescences du maïs (*Zea mays* L.) et du sorgho (*Sorghum* spp.) à *Sphacelotheca reiliana* (Khun) Clinton: étude de la maladie sur maïs, et approche de la variabilité de l'agent pathogène. Thèse docteur ingénieur, Montpellier.
- WATSON I.A., 1970 - Changes in virulence and population shifts in plant pathogens. *Annual Rev. Phytopathol.* 8: 209-230.
- WESTERN J.H., 1937 - Sexual fusion in *Ustilago avenae* under natural conditions. *Phytopathology* 27: 547-553.
- ZAMBETTAKIS C., 1973 - Recherches sur la germination des téiospores des Ustilaginales. *Bull. Soc. Mycol. France* 89: 253-275.
- ZAMBETTAKIS C., 1977 - La sexualité chez les Ustilaginales. Revue bibliographique: première partie. *Rev. Mycol. (Paris)* 41: 469-491.
- ZAMBETTAKIS C., 1978 - La sexualité chez les Ustilaginales. Revue bibliographique: deuxième partie. *Rev. Mycol. (Paris)* 42: 13-39.